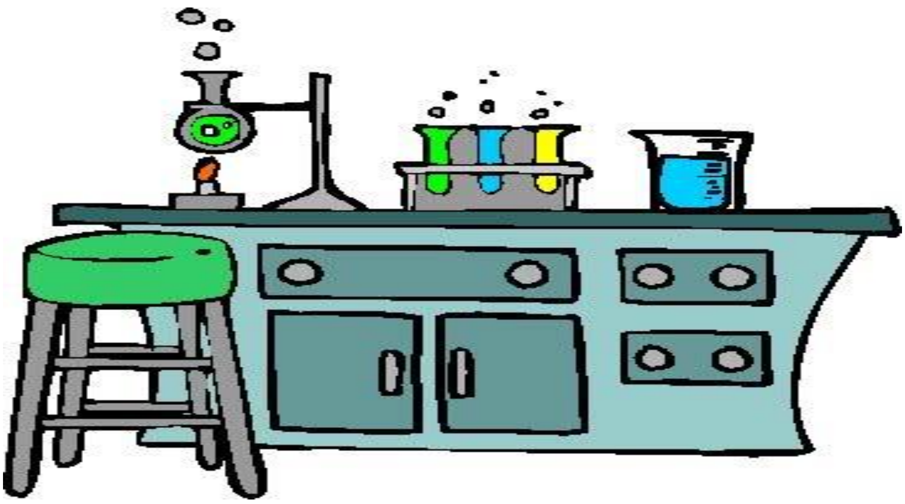
جامعة بنها
كلية الزراعة
قسم النبات الزراعى
فرع الميكروبيولوجيا الزراعية

الدروس العملية
فى
الإنزيمات الميكروبية

لطلبة الفرقة الثالثة
برنامج البيوتكنولوجى



إعداد
د/ رشا محمد الميهى
مدرس الميكروبيولوجيا الزراعية
٢٠١٤

بسم الله الرحمن الرحيم

المحتويات

م	الموضوع	رقم الصفحة
١	التعقيم	٤
٢	البيئات الميكروبية	
٣	عزل الميكروبات	
٤	الإنزيمات: تعريفها، أقسامها، أهميتها	
٥	تقدير إنزيم الكتاليز **Catalase** الناتج بواسطة الميكروبات	
٦	تقدير إنزيم الأميليز **Amylase** الناتج بواسطة الميكروبات	
٧	تقدير إنزيم **Oxidase** الناتج بواسطة الميكروبات	
٨	تقدير إنزيم السليوليز **Cellulase** الناتج بواسطة الميكروبات	
٩	تقدير إنزيم البكتينيز **Pectinases** الناتج بواسطة الميكروبات	
١٠	تقدير إنزيم الجيلاتينيز **Gelatinase** الناتج بواسطة الميكروبات	
١١	تقدير إنزيم البروتييز **Proteases** الناتج بواسطة الميكروبات	
١٢	تقدير إنزيم اليوريز **Urease** الناتج بواسطة الميكروبات	
١٣	تقدير إنزيم **Cysteine desulforase** الناتج بواسطة الميكروبات	
١٤	تقدير إنزيم **Tryptophanase** الناتج بواسطة الميكروبات	
١٥	تقدير إنزيم **Deoxyribonuclease** الناتج بواسطة الميكروبات	
١٦	تقدير إنزيم اللايبيز **Lipases** الناتج بواسطة الميكروبات	
١٧	تقدير إنزيم **Caseinase** الناتج بواسطة الميكروبات	

مقدمة

التعقيم Sterilization

التعقيم هو عملية الغرض منها الإبادة الكاملة لجميع الميكروبات الحية الموجودة بالأدوات أو المواد سواء أكانت على الحالة الخضرية أو جراثيم وللتعقيم فوائد عظمى فهو يستعمل في الأغراض التالية:

١- في الأعمال البكتريولوجية خاصة عند عزل وتنقية نوع من البكتريا وحفظه في مزرعة نقية.

٢- في الأغراض الطبية لتطهير الأدوات والأجهزة المستعملة لمنع التلوث والعدوى.

٣- في الأغذية للتخلص مما بها من ميكروبات فيمكن حفظها لمدد طويلة.

وعادة يتم التعقيم بإتباع طرق تعتمد على أسس فيزيائية أو كيميائية أو ميكانيكية.

الطرق الفيزيائية Physical methods

تعتبر الحرارة المرتفعة وكذلك بعض الإشعاعات من أهم العوامل الفيزيائية التي تستعمل في أغراض التعقيم.

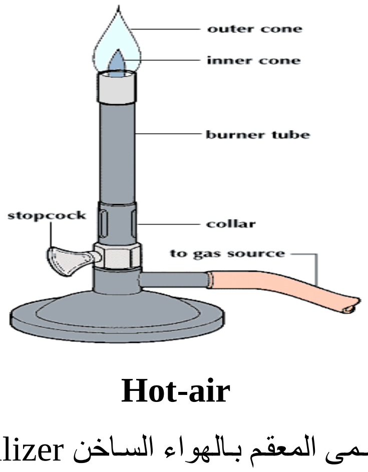
أولاً: التعقيم بالحرارة Sterilization by heat

ويتم بإحدى طريقتين الحرارة الجافة Dry heat أو الحرارة المصحوبة برطوبة moist heat ويلاحظ أن التعقيم بالحرارة الجافة تحتاج إلى مدة أطول ودرجة حرارة أعلى من التعقيم بالحرارة الرطبة أي أن الرطوبة تساعد على تخلل الحرارة جسم الكائن الحي فيتأثر البروتوبلازم بسرعة.

أ- الحرارة الجافة وتشمل:

١) إستعمال اللهب المباشر Flaming

ويستخدم في ذلك لهب بنزن لتعقيم الأدوات التي تتحمل التعرض للهب مثل إبر التلقيح و الشرائح الزجاجية وأغطيتها وأفواه أنابيب المزارع و ذلك بتمرير المواد في اللهب عدة مرات - و تعقيم المشارط و الهاون ويد الهاون- بغمسها في الكحول الذي يشعل بتعريضه للنار وتكرر العملية عدة مرات٠



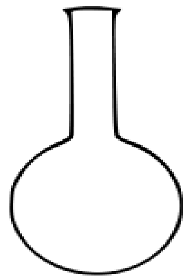
٢) الهواء الساخن Hot-air

ويستخدم لذلك جهاز خاص يسمى المعقم بالهواء الساخن Hot air sterilizer وتستعمل هذه الطريقة أساسا لتعقيم الأدوات والأواني الزجاجية التي تطلب في حالة جافة ولا يمكن تعقيمها في اللهب

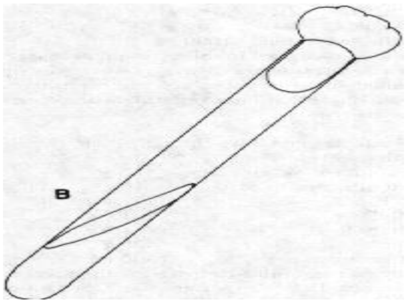
المباشر، مثل أطباق بتري وزجاجات العينات والماصات والدوارق وخلافة. وعند تعقيم هذه الأدوات فان الماصات وأطباق بتري توضع في علب معدنية خاصة تسمى علب التعقيم ثم توضع هذه العلب داخل المعقم ثم تحفظ مغلقة بعد تعقيمها لحين استعمالها أما الأنابيب والدوارق فتوضع بعد سدها بسدادات قطنية في أسبتة من السلك وتغطى هذه بالورق الكرافت قبل تعقيمها.

ودرجة الحرارة المستعملة في التعقيم لهذه الأدوات بهذه الطريقة هي ١٨٠°م لمدة نصف ساعة أو لدرجة ١٦٠°م لمدة ساعة إذا ما أريد تعقيمها تعقيما كاملا أي إبادة جميع البكتريا وجراثيمها.

وتستعمل درجة ١٨٠°م لمدة نصف ساعة عند تعقيم الأدوات الزجاجية الغير مغطاة بسدادات قطنية كأطباق بتري.



أما الأدوات المغطاة بسدادات قطنية كالماصات والأنابيب والدوارق الفارغة حتى لايتكربن القطن أو يحترق فان الدرجة التي تستخدم هي ١٦٠°م لمدة ساعة.



والمعقم بالهواء الساخن عبارة عن فرن كهربائي به أرفف وله منظم خاص (ثرموستات) لضبط درجة الحرارة أوتوماتيكيا كما يوجد به ترمومتر ويغطي الجدار الخارجي للجهاز عادة بمادة عازلة كالإسبستوس لتقليل فقد الحرارة منه.

ويراعى عند التعقيم بهذه الطريقة الاحتياطات التالية:

١- أن تكون الأدوات المراد تعقيمها تامة الجفاف.

٢- أن توضع الأدوات في المعقم قبل البدء في تسخين الجهاز.

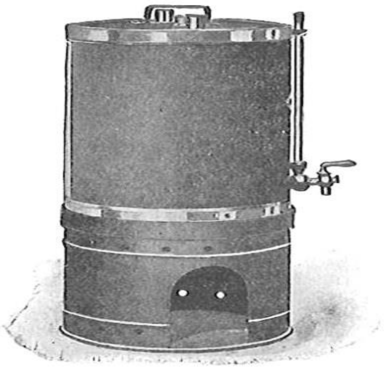
٣- أن تترك الأدوات في المعقم بعد انتهاء التعقيم إلى أن تبرد تماما لأن التبريد أو التسخين الفجائي للأدوات قد يسبب كسرها، كما أن فتح العلب المحتوية على أطباق بتري أو الماصات قبل أن تبرد قد يتسبب في تلوثها نتيجة دخول هواء خارجي قد يكون محملا بالميكروبات.

ب- التعقيم بالحرارة المصحوبة برطوبة (أي باستخدام البخار).

ويكون ذلك بإحدى الطرق التالية:

١) التعقيم بالبخار على درجة ١٠٠ °م

وتسمى هذه الطريقة أيضاً بطريقة التعقيم بالبخار المنساب أو بطريقة التعقيم المتقطع بالبخار والجهاز المستعمل يسمى جهاز أرنولد Arnold وتستعمل هذه الطريقة في تعقيم البيئات التي تتغير خواصها الطبيعية أو الكيماوية إذا ما تعرضت لدرجة حرارة أعلى من ١٠٠°م مثل بيئة السكريات وبيئة اللبن وبيئة الجيلاتين.



وتعقم هذه المواد بتعريضها للبخار لمدة ٢٠ دقيقة يوميا لمدة ثلاثة أيام متعاقبة مع ترك مدة مقدارها ٢٤ ساعة بين كل مرة وأخرى ولهذا يسمى بالتعقيم المتقطع وفي هذه الطريقة فان الخلايا الخضرية تقتل في اليوم الأول بينما لا تتأثر الجراثيم وهذه بتركها في البيئة في جو الغرفة لمدة ٢٤ ساعة فإنها تنبت وتتحول إلى خلايا خضرية تقتل بتعريضها لدرجة ١٠٠°م في اليوم الثاني ويجري التعقيم في اليوم الثالث للتأكد من قتل جميع الميكروبات وبذلك يتم تعقيم البيئة دون أن تتأثر محتوياتها.

٢) التعقيم بالبخار تحت ضغط Steam under pressure

الجهاز المستعمل في هذه الطريقة يسمى الأوتوكلاف Autoclave أو المعقم بالبخار المضغوط - وتعتبر هذه الطريقة من أحسن وأسرع وسائل التعقيم لان رفع الضغط داخل الجهاز يؤدي إلى رفع درجة الحرارة عن١٠٠°م مما يسهل قتل الجراثيم البكتيرية التي تتحمل درجات الحرارة العالية ويستعمل الأوتوكلاف أساسا لتعقيم البيئات البكتيرية التي تتحمل درجات الحرارة المرتفعة مثل بعض البيئات ذات السكريات الأحادية وأجار الجلوكوز والأجار المغذي، وبالإضافة إلى ما سبق فانه يمكن تعقيم المواد التالية بالأوتوكلاف :

١- الشاش والقماش والقطن والفوط والملابس والبلاطي.

٢- المرشحات المختلفة مثل مرشح زايتس.

٣- الأغذية المعلبة.

٤- المزارع التي يراد التخلص منها بعد انتهاء العمل بها خاصة مزارع البكتريا المرضية.

جهاز الأوتوكلاف Autoclave

عبارة عن إناء معدني سميك يتحمل الضغط و له غطاء سميك يثبت به بمشابك لولبية مركب عليه صنبور ومانومتر لقياس الضغط و صمام أمن وترمومتر ويوجد في قاع الجهاز علامة يضبط عندها مستوى الماء قبل الاستعمال كما أن بداخله أرفف مناسبة يوضع عليها الأدوات المراد تعقيمها و يسخن الماء بالجهاز من أسفل بالغاز أو بالكهرباء.

والفكرة في استعمال هذا الجهاز أنه بغليان الماء في جو مغلق فان الضغط داخل الجهاز يرتفع و يرتفع تبعا لذلك درجة غليان الماء عن١٠٠°م فتزيد درجة حرارة البخار المحبوس ، و لقد درج المانومتر الملحق بالجهاز بحيث أن القراءة صفر تساوي الضغط الجوي العادي أي تساوي ١٥ رطل/البوصة المربعة و علي ذلك فان الضغط الذي يبينه المانومتر هو ضغط ظاهري أما الضغط الحقيقي فيساوى الظاهري مضافاً إليه ضغط جوي واحد أي ١٥ رطل/البوصة المربعة وعادة يستخدم في التعقيم ضغط ظاهري ١٥رطل/بوصة مربعة لمدة ١٥- ٢٠ دقيقة .

ثانياً : الإشعاعات Radiations

يستفاد عمليا من التأثير الضار لبعض الإشعاعات على خلايا البكتريا في تعقيم الأماكن كغرف العمليات الجراحية و عنابر تعبئة الأدوية و العقاقير المعقمة أو في تعقيم غرف التلقيح الملحقة عادة بالمعامل البكتريولوجية الكبيرة، وفي بعض الصناعات الغذائية أو صناعة الألبان أو في تعقيم السطوح الكبيرة الملوثة و في محطات الحجر الزراعي لتطهير المنتجات الزراعية مما يكون عالقا بها من كائنات ممرضه يخشى انتقالها من مكان إلى آخر . كما يمكن تعقيم أطباق بتري أو الماصات المصنوعة من البلاستيك بواسطة الأشعة فوق البنفسجية بعد تغليفها في أكياس مغلقة من البولي إثيلين و ذلك خوفا من استعمال الحرارة.

تستخدم الأشعة فوق البنفسجية ultraviolet radiation عادة في التعقيم ويمكن الحصول عليها من لمبات خاصة يمكنها أن تشع تركيزات مرتفعة من هذه الأشعة والتي يتراوح موجاتها من ٢٦٠ إلى ٢٧٠ مللي ميكرون وهو النطاق الفعال في إبادة الأحياء الدقيقة.

الطرق الكيميائية Chemical methods

لا تستخدم هذه الطريقة في تعقيم الأدوات الميكروبيولوجية التي ينمي بها كائنات حية و لكنها تستعمل بكثرة في عمليات الحفظ و التطهير، يمكن استعمال بعض المواد الكيماوية في أغراض التعقيم و ذلك لفعلها المميت أو الموقف لنمو خلايا الأحياء الدقيقة ، و فيما يلي بعض المواد الكيماوية التي تستعمل في صورة محاليل أو في صورة غازات للتعقيم السطحي للمواد التي لا يمكن تعقيمها بالطرق الحرارية.

و من أمثلة المواد الكيميائية المستعملة:

كحول الإيثايل Ethyl alcohol

يستعمل عادة كحول الإيثايل بتركيز يتراوح بين ٥٠- ٧٠% في تطهير الأيدى أو المناطق المختلفة في جسم الإنسان، و الفكرة الأساسية للفعل السام للكحول يرجع إلي انه يعمل على تجفيف الخلايا Dehydrating agent حيث يسحب الماء منها، علاوة على قدرته على تجميع وتخثر البروتين الخلوى عندما يتطرق إلى داخل الخلايا، الأمر الذي يؤدى إلى موت الخلية. ويقال أن قلة الكفاءة التعقيمية للتركيزات الكحولية التي تزيد عن ٧٠% وكذلك الكحول ا لمطلق النقى ١٠٠% قد ترجع إلى زيادة فعله المجفف بمعنى زيادة كمية الماء المزالة من الخلايا بدرجة تعوق دخول الكحول إلى الخلايا، لذلك يكون تأثير التركيزات المرتفعة من الكحول تأثيراً مجففاً فقط وهذا يتسبب عنه إيقاف لنمو الخلايا Bacteriostatic action ومما هو جدير بالذكر انه ليس للكحول بجميع تركيزاته أي تأثير ضار على الجراثيم الداخلية.

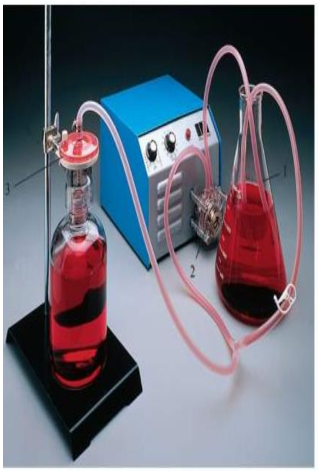
الطرق الميكانيكية Mechanical methods

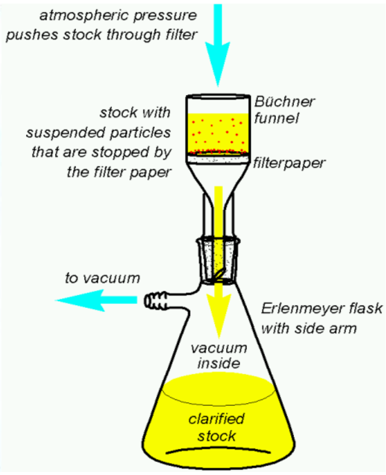
تعتمد هذه الطرق على إزالة خلايا الكائنات الحية الدقيقة من الوسط الكامنة فيه بطريقة ميكانيكية كأن تحجز ثقوب المرشحات المستعملة خلايا الكائنات الحية ذات الأقطار التي تزيد عن أقطار ثقوبها.

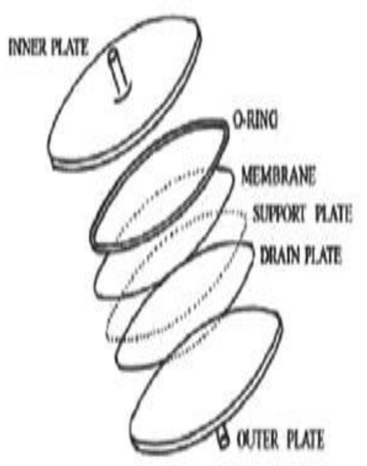
الترشيح Filtration

يستعمل لذلك مرشحات بكتيرية يتراوح قطر ثقوبها بين أقل من ميكرون واحد إلى عدة ميكرونات. ويراعى أن التعقيم بالترشيح لا يتوقف فقط على قطر الثقوب، بل يتوقف أيضاً على الشحنة الكهربية للمرشح وكذلك الشحنة الكهربية للكائنات الدقيقة المحتوي عليها السائل وكذلك على طبيعة ذلك

السائل المراد ترشيحه. وعادة يسحب السائل خلال المرشح بإحداث ضغط سالب (تفريغ) على الجانب الآخر من المرشح حيث تستخدم مضخة تفريغ مائية أو كهربائية.







المرشحات البكتيرية

وتستخدم هذه الطريقة لعدة أغراض:

١. في تعقيم الهواء والغازات بتمريرها في أنابيب تحتوي على قطع قطن معقمة أو مرشحات خاصة.

٢. في تعقيم السوائل أو البيئات التي يخشى عليها من تحللها إذا عقمت بالحرارة مثل سيروم الدم والإنزيمات والتوكسينات.

٣. في الأغراض العلمية لحجز البكتريا من السوائل أو البيئات عندما يراد دراسة ما بها من فيروسات إذ أن المرشحات البكتيرية لا تحجز الفيروسات بل تمر من خلالها.

وعند تعقيم السوائل والبيئات يستخدم لذلك مرشحات خاصة ذات مسام صغيرة جدا وتحجز البكتريا بواسطة المرشحات لصغر حجم مسام المرشحات وأيضاً لما تحمله سطوح هذه المرشحات من شحنة كهربائية وقوة إدمصاص كبيرة من شأنها إدمصاص البكتريا على السطح وبذلك تمنعها من المرور عند الترشيح.

البيئات الميكروبية Microbial media

إن غالبية الدراسات والبحوث الميكروبيولوجية تتطلب استعمال بيئات زرع مختلفة تحضر بالمعمل، وهذه البيئات وإن لم تكن متماثلة تماماً مع البيئات التي تعيش عليها هذه الكائنات في الطبيعة إلا أنها قريبة الشبه منها وتوفر الإحتياجات والمتطلبات الغذائية اللازمة لتنميتها.

تنمى الميكروبات عادة على بيئات خاصة وهي عبارة عن مواد غذائية معينة تنمو عليها الميكروبات وهي تستعمل لأغراض عديدة منها:

١- تنمية الميكروبات واستكثارها وحفظها.

٢- دراسة خواص الميكروبات المختلفة.

٣- دراسة تأثير الميكروبات على بعض المواد في البيئة.

٤- تشجيع الميكروبات على إنتاج مواد معينة في البيئة ذات أهمية صناعية.

وتقسم البيئات إلى:

أولاً : حسب طبيعة تركيبها

أ- بيئات طبيعية Natural media

وهي تتكون من مواد غذائية طبيعية ويشاهد ذلك في حالة البكتريا المرضية والفيروسات التي تنمو في الأنسجة الحية أو الميكروبات التي تنمو في الدم أو اللبن أو التربة الزراعية.

ب- بيئات صناعية Synthetic media

وهي البيئة التي تتكون من مواد كيماوية عضوية وغير عضوية، وتنقسم إلى قسمين:

١- بيئات محددة التركيب الكيماوي (بيئة صناعية مخلقة).

تتكون من مواد ذات تركيب كيماوي معروف، وقد تتكون من أملاح غير عضوية أو مخلوط من الأملاح غير العضوية ومركبات عضوية.

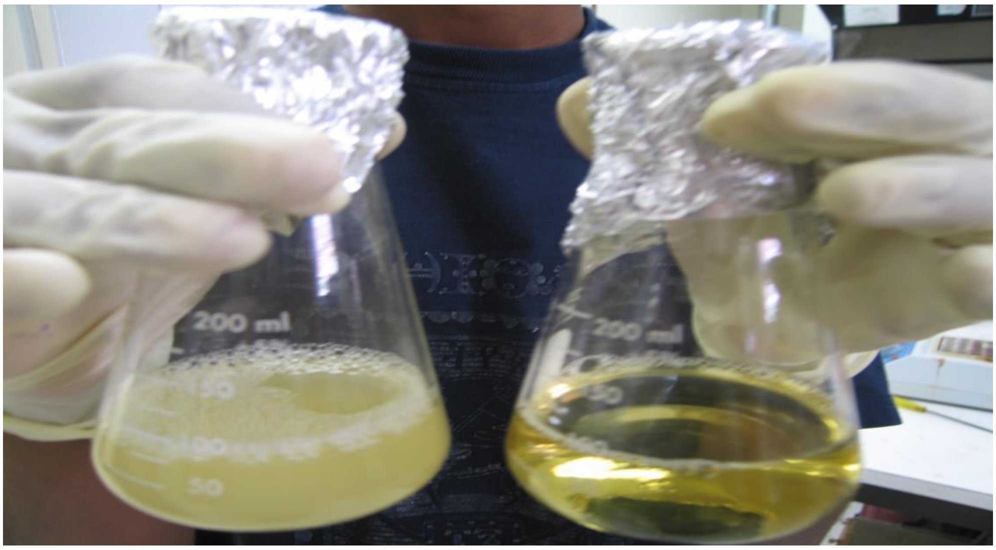
٢- بيئات غير محددة التركيب الكيماوي (بيئة صناعية غير مخلقة).

تتكون من مكونات غير معروفة التركيب الكيماوي مثل البيئات التي يدخل في تركيبها الببتون ومستخلص اللحم والدم أو سيرم الدم ومستخلصات الأنسجة النباتية أو الحيوانية.

ثانيا: حسب قوام البيئة

أ- **بيئات سائلة liquid media** كبيئة البويون (المرق) ولبن عباد الشمس.

ب- **بيئات صلبة solid media** وهي عبارة عن بيئات توجد على الحالة الصلبة على درجة حرارة الغرفة بسبب إضافة بعض المواد مثل الجيلاتين أو الأجار التي تحدث الصلابة كبيئة الأجار المغذي المضاف إليه مادة الأجار أجار أو الجيلاتين المغذي المضاف إليها الجيلاتين، ويلاحظ أن هناك بعض بيئات خاصة تستعمل في عزل وتنمية وعد نوع معين من الميكروبات وذلك بإضافة بعض المواد الكيماوية إليها، مثل بيئة السليكاجل.



Solid media Broth media

الطريقة المعتادة في تحضير البيئة الغذائية تتلخص فيما يلي:

١) وزن المكونات المطلوبة ووضعها في وعاء مناسب.

٢) إضافة كمية الماء المطلوبة ثم إذابة المكونات - وقد يحتاج الأمر إلى الغليان في حمام مائي أو في إناء معدني مزدوج الجدار، مع إضافة ماء لتعويض ما يفقد بالبخار.

٣) ضبط الـ pH.

جهاز pH meter

٤) يرشح المحلول وهو ساخن مستعملا قطنا رطبا بالماء الساخن.

٥) تعبئة البيئة في العبوات المناسبة مثل الأنابيب أو الزجاجات أو الدوارق وذلك حسب الرغبة ثم التغطية بسدادات قطنية.

٦) التعقيم في الجهاز المناسب وذلك حسب تركيب البيئة، ثم الحفظ في مكان مناسب لحين الاستعمال، ويجب ضبط pH البيئة حسب نوع الميكروب الذي ينمى عليها فبعضها يتطلب وسطا حامضياً والبعض وسطا قلويا ولكن الأغلبية العظمى تحتاج إلى وسط متعادل أو قلوي ضعيف (pH ٧ – ٧,٢).

عـــزل البكتريا وتنقيتــها Isolation and purification of bacteria

لاتوجد البكتريا في الطبيعة كل نوع منعزل على حده بل توجد مختلطة مع بعضها ولدراسة خواص كل نوع يتحكم عزله بحالة نقية بحيث لا يصبح في المزرعة إلا نوع واحد من الميكروبات وهو المراد دراسته. وتجرى عملية العزل بعدة طرق منها:

١- العزل بالأطباق المصبوبة Pouring plate method

٢- العزل بالأطباق المخطوطة Streaking plate method

٣- العزل بالتخفيف Diluting method

■ عزل البكتريا بطريقة الأطباق المصبوبة

الغرض من هذه الطريقة هو تخفيف المزرعة بحيث عند تنمية الميكروبات في الأطباق تنمو بعيدة عن بعضها في مجاميع أو مستعمرات منعزلة عن بعضها كل مستعمرة ناتجة عن ميكروب واحد أي في مستعمرات نقية.

طريقة العمل

١) سيح ثلاث أنابيب أجار مغذى عميق على حمام مائى يغلى ثم برد إلى ٥٠°م باستعمال الترمومتر.

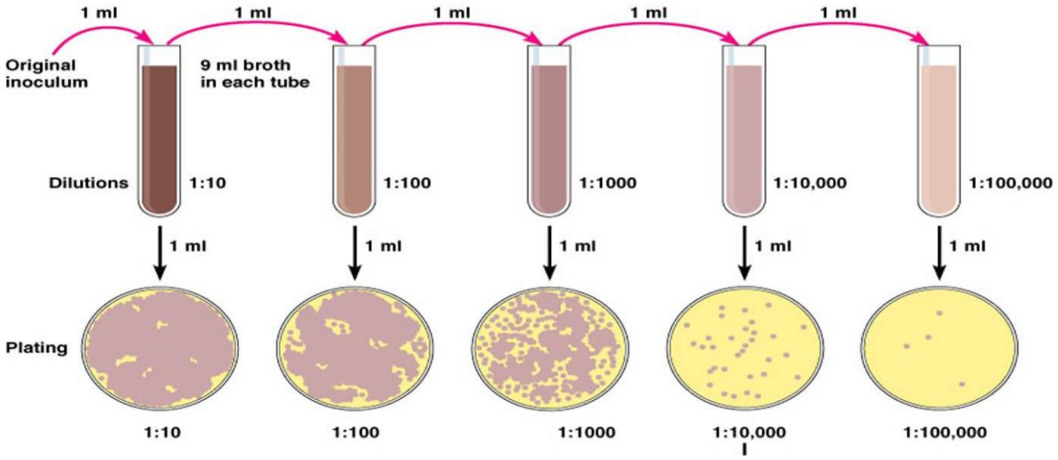
٢) لقح الأنبوبة الأولى بغمس إبرة من المزرعة المختلطة تحت ظروف التعقيم ثم رج الأنبوبة بين راحتى اليد لتوزيع البكتريا فيها.

٣) خذ بالإبرة المعقمة ٢ غمسه إبرة من الأنبوبة الأولى وانقلهم إلى الأنبوبة الثانية تحت ظروف التعقيم ثم رج الأنبوبة جيداً كما سبق.

٤) خذ بالإبرة المعقمة ٣ غمسات إبرة من الأنبوبة الثانية وانقلهم إلى الأنبوبة الثالثة ثم رجها أيضا.

٥) صب الأنابيب الثلاثة في ثلاث أطباق بترى معقمة مع تحريك الطبق بعد الصب حركة دائرية خفيفة منتظمة حتى يتوزع الأجار المغذى في كل مساحة الطبق ثم رقم الأطباق بالأرقام ١، ٢، ٣ وأتركهم ليتجمد الأجار، ضع الأطباق في المحضن مقلوبة على ٣٧ °م لمدة ٤٨ ساعة.

٦) بعد انتهاء فترة التحضين اختر بعض المستعمرات المتباعدة وأعمل منها غشاء واصبغه بطريقة جرام وافحصه فإذا ظهر من الفحص بان المستعمرة نقية فيلقح منها أنبوبة أجار مائل وتحضن لتنمو وبذلك تحصل على مزرعة نقية لكل من الميكروبين.



■ **عزل البكتريا بطريقة الأطباق المخطوطة**

الغرض من التخطيط هو تقليل عدد البكتريا العالق بإبرة التلقيح بحيث في نهاية خطوط التلقيح تصبح الميكروبات متباعدة في الطبق وتنمو وتكون مستعمرات منعزلة ونقية.

طريقة العمل

١) سيح أنبوبتي أجار عميق في حمام مائى يغلى ثم يبرد إلى ٥٠ °م وصب محتويات كل أنبوبة في طبق بترى معقم مع إدارة الطبق بهدوء حتى يتوزع الأجار في كل الطبق بانتظام.

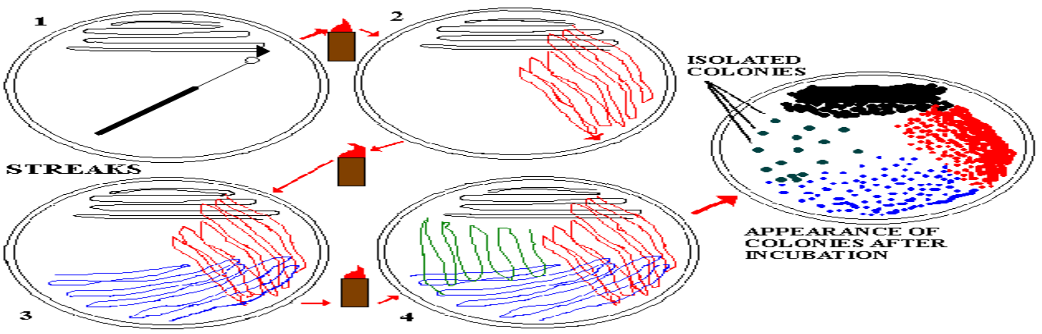
٢) اترك الأطباق حتى يتجمد الأجار.

٣) خذ بإبرة التلقيح بعد تعقيمها غمسة إبرة من المزرعة المختلطة ثم افتح الطبق بمقدار ما يسمح بدخول الإبرة ثم خطط بخفة بخطوط متوازية بين كل منها طول نصف بوصة مع الحرص من عدم تجريح الأجار.

٤) نفس الإبرة بدون تعقيمها أو أخذ غمسه جديدة خطط الطبق الثانى ثم الثالث.

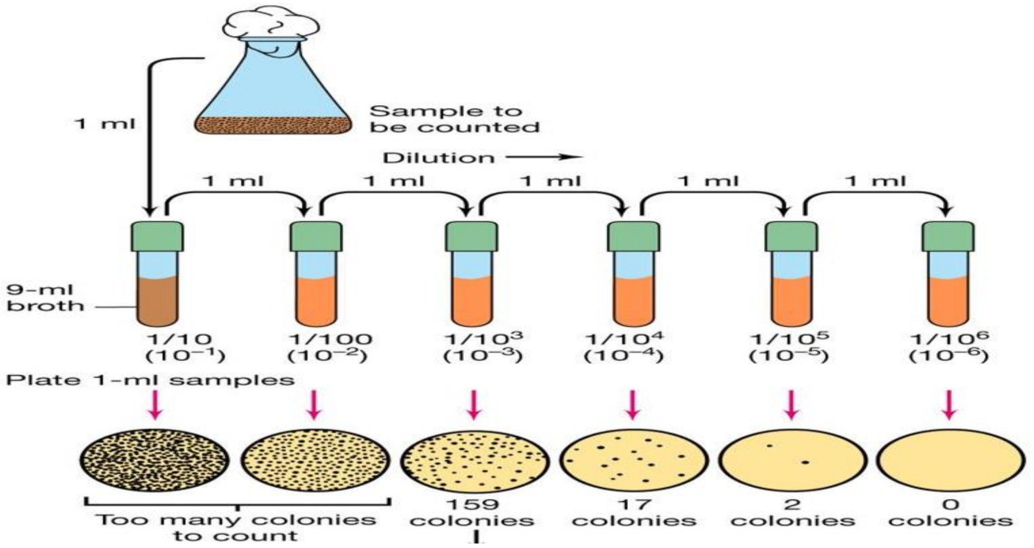
٥) رقم الإطباق وضعها في المحضن مقلوبة على ٣٧ °م لمدة ٤٨ ساعة.

٦) بعد انتهاء فترة التحضين افحص الأطباق اختر مستعمرات منعزلة واجري عليها ما سبق في التمرين السابق للحصول على مزارع نقية على الأجار المائل.



عزل البكتريا بطريقة التخفيف

إذا كانت الميكروبات المختلطة في مزرعة سائلة وكان أحد هذه الميكروبات موجوداً بنسبة أعلى من الميكروبات الأخرى فعند تخفيف المزرعة في محلول فسيولوجى معقم أو في مرق مغذى معقم نصل في النهاية (بعد التخفيف عدة مرات) إلى وجود الميكروبات السائدة على حالة نقية.



الإنزيمات الميكروبية Microbial enzymes

تعريفها

الإنزيمات عبارة عن مواد عضوية (بروتينية) تنتجها الخلايا الحية وتوجد بداخل الخلية بكميات ضئيلة جدا، وللإنزيمات خاصية الإسراع من التفاعلات الكيميائية دون أن تستهلك فى التفاعل وبذلك فهى يطلق عليه عوامل مساعدة حيوية Biological catalysts.

خواصها

١) تتميز بقدرتها على بدء التفاعل دون الحاجة إلى طاقة عالية، وقدرتها الكبيرة على إجراء التحولات الكيميائية.

٢) تتميز بدرجة تخصصها العالية وبفقد نشاطها فى وجود المثبطات.

٣) وزنها الجزيئى كبير.

٤) لها نفس خواص البروتينات.

٥) للخلية الميكروبية الواحدة القدرة على إنتاج آلاف الإنزيمات.

أقسامها

تقسم الإنزيمات التى تفرزها خلايا الميكروب على أساس:

- **إفرازها فى وجود أو غياب مادة التفاعل**

١- إنزيمات بنائية Constitutive enzymes

وهى تنتج داخل الخلية الميكروبية بصفة مستمرة فى وجود او غياب مادة التفاعل داخل البيئة ومنها إنزيمات التنفس الخلوية.

٢- إنزيمات مستحثة Adaptive enzymes

وهذه الإنزيمات تنتجها الخلية الميكروبية عند الحاجة إليها أى عند تواجد مادة التفاعل فى البيئة ومنها إنزيم اللاكتيز Lactase الذى تفرزه بكتريا *E. coli* فى وجود سكر اللاكتوز بالبيئة.

- **إفرازها داخل أو خارج الخلية**

١- الإنزيمات الداخلية Intracellular enzymes

تتكون جميع الإنزيمات بداخل الخلية الميكروبية وعقب الإفراز يبقى بعض الإنزيمات بداخل الخلية وتسمى الإنزيمات الداخلية ولايمكن إستخلاصها منها إلا بتكسير الخلية بصورة كاملة وخروج محتوايتها. ومنها إنزيمات التنفس وإنتاج الطاقة.

٢- الإنزيمات الخارجية Extracellular enzymes

بعض الإنزيمات عقب تكونها داخل الخلية الميكروبية فإنها تخرج من الخلية إلى الوسط الخارجى وتسمى الإنزيمات الخارجية وهى تقوم بنشاطها الحيوى خارج الخلية. وهى من النوع المحلل

مائيا، ويعتمد عملها على أساس تحليل المواد الغذائية المعقدة الموجودة بالوسط الخارجى للخلية ليسهل نفاذها إلى داخل الخلية وتمثيلها. ومنها الإنزيمات المحللة للمواد الكربوهيدراتية.

■ **تأثيرها على جزىء مادة التفاعل**

١- إنزيمات داخلية التأثير Endoenzymes

وهى تؤثر على جزئ مادة التفاعل من داخل الجزىء نفسه وليس من أطرافه فتحلل الجزئ الكبير إلى جزئ صغير، مثل إنزيم ألفا أميليز الذى يؤثر على جزئ النشا من الداخل فيحلله إلى وحدات أصغر هى الدكسترين.

٢- إنزيمات خارجية التأثير Exoenzymes

تؤثر على جزئ مادة التفاعل من أطرافه الخارجية فتحلله إلى وحدات أصغر وبمعنى آخر تسمح بإنفراد وحدات صغيرة من أطراف الجزئ، مثل إنزيم البيتا أميليز الذى يحلل جزئ الدكسترين من أطرافه وينفرد المالتوز وهو سكر ثنائى يتكون من وحدتين من سكر الجلوكوز.

■ **أنواع التفاعلات الكيميائية التى تجريها**

١- إنزيمات الأكسدة والإختزال Oxidation-reduction enzymes

وهى مجموعة من الإنزيمات المسئولة عن نقل الإلكترونات ونقل ذرات الهيدروجين (إضافة - إزالة) من وإلى مادة التفاعل والتى قد يحدث لها إما أكسدة أوإختزال، ومنها:

أ- إنزيمات الأكسدة: Peroxidase – Catalase – Oxidase

ب- إنزيمات الإختزال: Dehydrogenase - Nitrogenase

٢- الإنزيمات الناقلة Transferases

هى مجموعة من الإنزيمات تكون مسئولة عن نقل مجموعات كيميائية عامة داخل الخلية مثل مجموعة الفوسفات والأمين والميثايل والأسيتايل، ومنها إنزيمات Kinases وهى إنزيمات ناقلة لمجموعة الفوسفات.

٣- إنزيمات التحلل المائى Hydrolases

وهى مجموعة من الإنزيمات التى تقوم بعملية التحلل المائى للمواد الغذائية بكسر رابطة كيميائية عن طريق إضافة جزئ ماء إليها، ومنها ما يفرز خارج خلية الميكروب ليحلل المواد العضوية المعقدة التركيب إلى مواد بسيطة يسهل على الميكروب تمثيلها، مثل:

أ- الإنزيمات المحللة للمواد الكربوهيدراتية (Cellulase – Pectinases – Amylases).

ب- الإنزيمات المحللة للمواد البروتينية (Peptidases – Protinases).

ومنها ما يوجد داخل الخلية الميكروبية وهى تكون مسئولة عن إتمام عملية تحلل المواد العضوية الداخلة إلى الخلية أو بناء مركبات عضوية جديدة لازمة للنمو.

٤- إنزيمات الإضافة والإزالة Lyases

وهى مجموعة من الإنزيمات التى تقوم بإضافة أو إزالة مجموعات كيميائية دون تحلل مائى وقد تقوم بإضافة أو كسر رابطة زوجية فى مركب، ومنها إنزيمات Carboxylases التى تقوم بنزع CO_2 من المركب.

٥- إنزيمات التشابه Isomerases

وهى مجموعة من الإنزيمات التى تقوم بتحويل المركب إلى مركب مشابه له ولكن يختلف عنه فى التركيب البنائى، ومنها الإنزيم الذى يحول سكر الجلوكوز إلى فركتوز أثناء عمليات التمثيل الغذائى.

٦- إنزيمات الربط Ligases

وهى تقوم بتكوين روابط جديدة بين جزيئين مع إزالة أو كسر لجزئ ATP.

وفيما يلى سوف يتم دراسة الطرق العملية لتقدير مجموعة من الأنزيمات سابقة الذكر

تقدير إنزيم الكتاليز Catalase

يعمل إنـزيم الكتـاليز علـى تحلـل فـوق أكسـيد الهيـدروجين إلـى مـاء وأكسـجين، وتمتلـك معظـم الميكروبـات الهوائيـة فـى خلاياهـا هـذا الإنـزيم حيـث أن وظيفـة هـذا الإنـزيم هـو إزالـة فـوق أكسـيد الهيدروجين السام الذى يتكون خلال تفاعلات الأكسدة والإختزال والتى تؤدى إلى موت الخلايا بالنسبة للميكروبات الهوائية.

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} H_2O + O_2$$

الأدوات والمواد اللازمة

- مزارع حديثة النمو من مجموعة من الميكروبات.
- محلول فوق أكسيد الهيدروجين ٣%.
- إبرة تلقيح بكتيرية.
- Micropipette.
- أطباق بترى معقمة.
- بيئة صلبة معقمة فى فلاسكة.

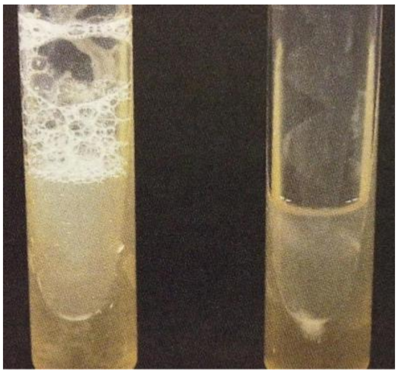
الطريقة

- يتم تسيح البيئة الصلبة المعقمة وصبها فى أطباق بترى معقمة وتركها حتى تتصلب.
- يلقح كل طبق بميكروب مختلف ويكتب إسم المكروب عليه.
- يترك طبق بدون تلقيح كمقارنة.
- تحضن الأطباق مقلوبة لمدة ٢٤ ساعة على درجة حراة ٣٠°م.
- بعد إنتهاء فترة التحضين يوضع ١-٢ مل من محلول فوق أكسيد الهيدروجين ٣% على سطح كل طبق بما فى ذلك معاملة الكنترول.
- يلاحظ ماذا يحدث وتسجل النتائج.

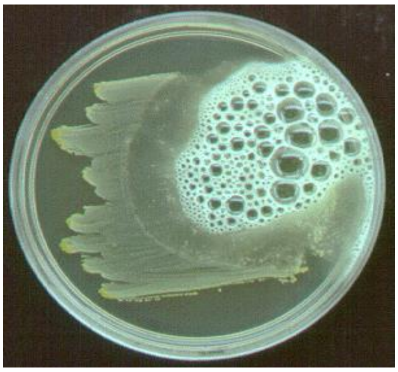
ملحوظة: يمكن إجراء الإختبار فى المزرعة السائلة

الملاحظة

فى حالة الميكروب المنتج لإنزيم الكتاليز يتكون فقاعات غاز الأكسجين على سطح النمو.



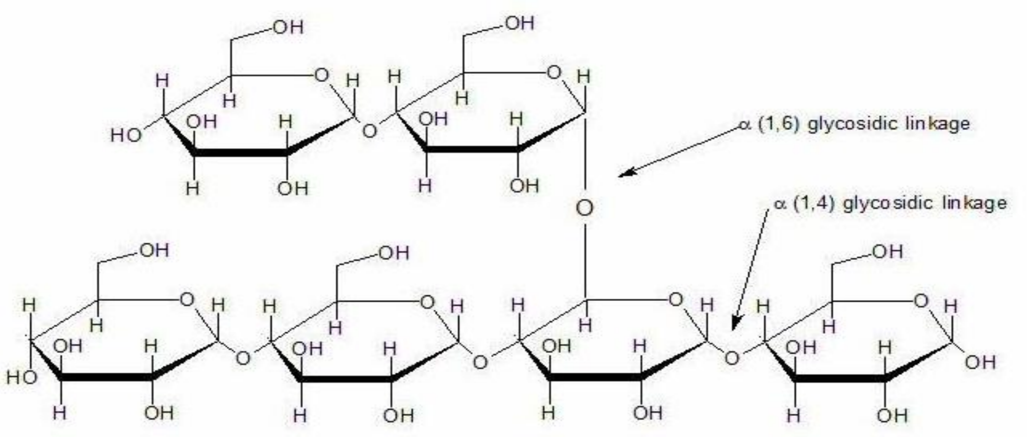
تكون الفقاعات على المزرعة السائلة



تكون الفقاعات فى المزرعة الصلبة

تقدير إنزيمات الأميليز Amylases

تتميز بعض الميكروبات بمقدرتها على إفراز إنزيمات الأميليز Amylases التى تحلل جزئ النشا خارج الخلية Hydrolysis of starch. ويتكون جزئ النشا من وحدات الجلوكوز مرتبط بروابط (α-glucosidic) فى سلسلة مستقيمة تسمى الأميلوز Amylose أو متفرعة وتسمى الأميلوبكتين Amylopectine ولا تستطيع البكتريا إستخدام جزئ النشا مباشرة لكبر حجمه ولعدم قابليته للذوبان فى الماء.



تركيب جزئ النشا

وتتكون مجموعة الإنزيمات المحللة لجزئ النشا من ثلاث إنزيمات هى:

(١) ألفا-أميليز α-Amylase

يقوم إنزيم الألفا-أميليز بتكسير جزئ النشا عشوائيا ويكسر الروابط فى جزئ الأميلوز والأميلوبكتين وينتج وحدات من سكر المالتوز والدكسترين ووحدات من الجلوكوز. ولكنه لايستطيع تكسير الراوبط الموجودة بين السلاسل المستقيمة والمتفرعة، ودرجة pH المثلى له هى ٦,٧-٧.

$$\textbf{Amylose} \xrightarrow{\alpha\text{-amylase}} \textbf{Maltotriose + Maltose}$$

$$\textbf{Amylopectine} \xrightarrow{\alpha\text{-amylase}} \textbf{Maltose + Glucose + Limit dextrin}$$

(٢) بيتا-أميليز β-Amylase

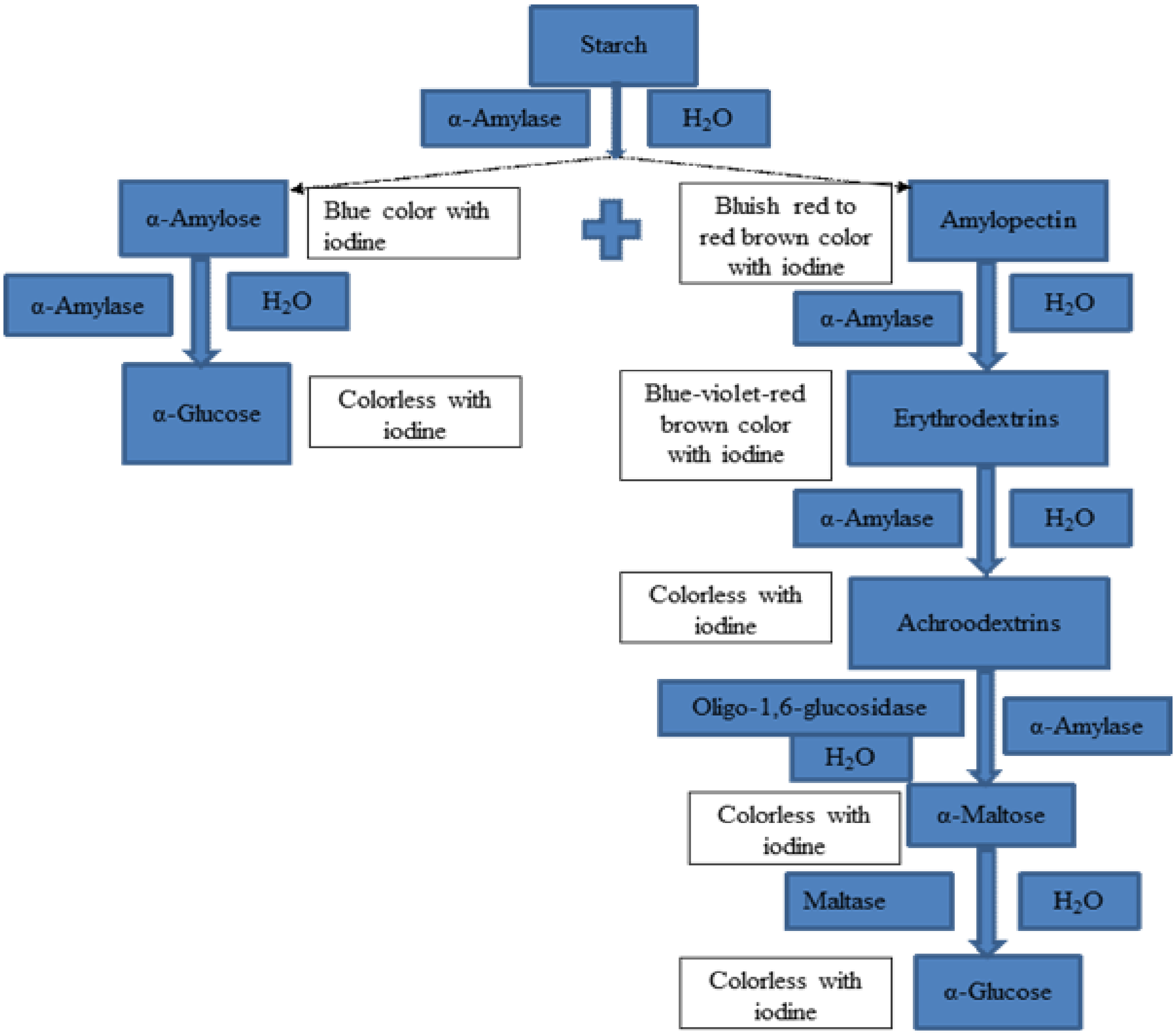
يقوم إنزيم بيتا-أميليز بتكسير الرابطة بين وحدتين سكر الجلوكوز فى جزئ سكر المالتوز تتكون وحدات مفردة من سكر الجلوكوز، ودرجة pH المثلى له هى ٤-٥.

$$\textbf{Maltose} \xrightarrow{\beta\text{-Amylase}} \textbf{2 units of Glucose}$$

(٣) جاما-أميليز γ-Amylase

يقوم إنزيم جاما-أميليز بتكسير سلاسل الأميلوز أو الأميلوبكتين من النهايات منتجة وحدات مفردة من سكر الجلوكوز، ودرجة pH المثلى له هى ٣.

Amylose or Amylopectin $\xrightarrow{\gamma\text{-Amylase}}$ **Glucose**



الأدوات والمواد اللازمة

- بيئة آجار النشا العميق Starch agar medium وتتكون من:

Components	g/L
Beef extract	3
Soluble starch	10
Agar	20
Distilled water	1000 ml
pH	7

- مزرعة *E. coli* ، مزرعة *B. subtilis*.

- أطباق بترى معقمة.
- محلول اليود ويتكون من:

Components	g/100ml
Potassium iodide (KI)	10
Iodine	5
Water	100 ml

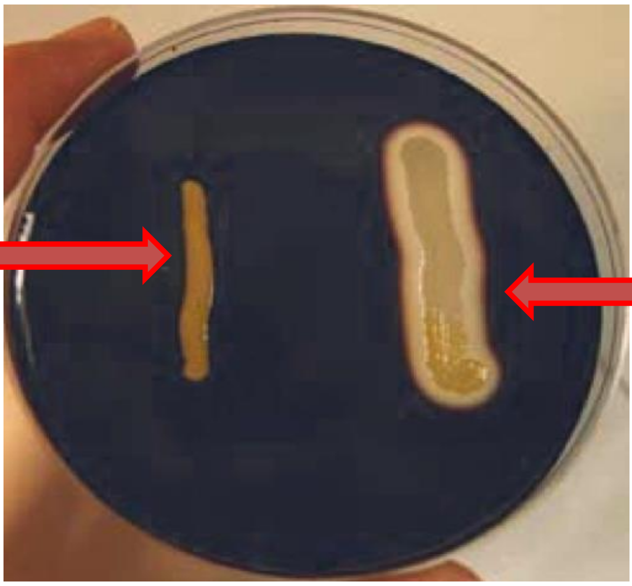
الطريقة

- يسيح أجار النشا ويبرد الى ٥٠°م ثم يصب فى أطباق بترى معقمة.
- بعد تصلب الأجار يلقح أحد الأطباق بغمسة من مزرعة *E. coli* ويلقح آخر بغمسه من مزرعة *B. subtilis*.
- تحضن الأطباق على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة.
- بعد فترة التحضين تغمر الأطباق بمحلول اليود.

الملاحظة

يلاحظ أن الميكروب المحلل للنشا محاط بهالة عديمة اللون بينما يأخذ باقى الطبق اللون الأزرق نتيجة لإتحاد اليود مع النشا.

لاحظ عدم وجود الهالة الشفافة حول النمو ويعنى ذلك نتيجة سالبة



لاحظ وجود الهالة الشفافة حول النمو ويعنى ذلك نتيجة موجبة

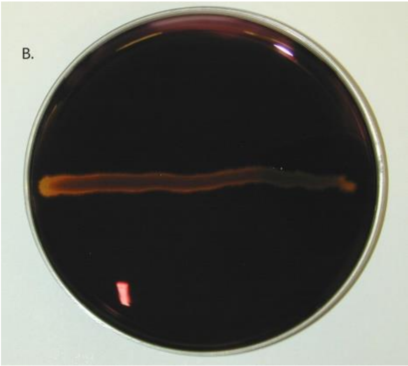
ملحوظة

يتم التحلل على مراحل وعند الكشف على عملية التحلل بواسطة محلول اليود فيختلف لون الناتج على حسب مرحلة التحلل كما فى الجدول التالى.

	Iodine
Starch	Blue
↓	
Maltose + Amylodextrin	Violet
↓	
Maltose + Erythrodextrin	Red
↓	
Maltose + Achrodextrin	No color
↓	
Maltose	

(١)

(٢)



(٣)

(٤)

(٥)

تقدير إنزيمات السليوليز Cellulases

تستطيع بعض الكائنات الحية الدقيقة تحليل السليولوز وهو عبارة عن مادة كربوهيدراتية تتكون من وحدات من سكر الجلوكوز مرتبطة مع بعضها طوليا بروابط من نوع بيتا (β-glucosidic) بين ذرة الكربون الأولى وذرة الكربون الرابعة لوحدة جلوكوز أخري من جزئ السكر لتكون سلاسل طويلة.

وجزئ السليولوز يتكون من ٢,٠٠٠ إلي ١٠,٠٠٠ وحدة جلوكوز وقد تصل أحياناً إلي ١٥,٠٠٠ وحدة جلوكوز، ويختلف عدد وحدات الجلوكوز في السلسلة وكذلك الوزن الجزئي للسليولوز بإختلاف نوع النبات.

ويتكون النظام الإنزيمي المحلل للسليولوز من ثلاث إنزيمات هى:

(١) إنزيم C1 (Endo-β-1,4 glucanase) : وهو يحلل المركب الأساسي (السليولوز) ويحدث له تحلل جزئي.

(٢) إنزيم Cx (Exo-β -1,4 glucanase) : يعمل على النواتج من تكسير الإنزيم الأول وينتج سكر ثنائي وهو السلوبيوز علاوة على سلاسل قصيرة من وحدات من الجلوكوز.

(٣) إنزيم glucosidase (β-1,4 glucosidase) : يحلل السكر الثنائي السلوبيوز والسلاسل القصيرة إلى وحدات من الجلوكوز.

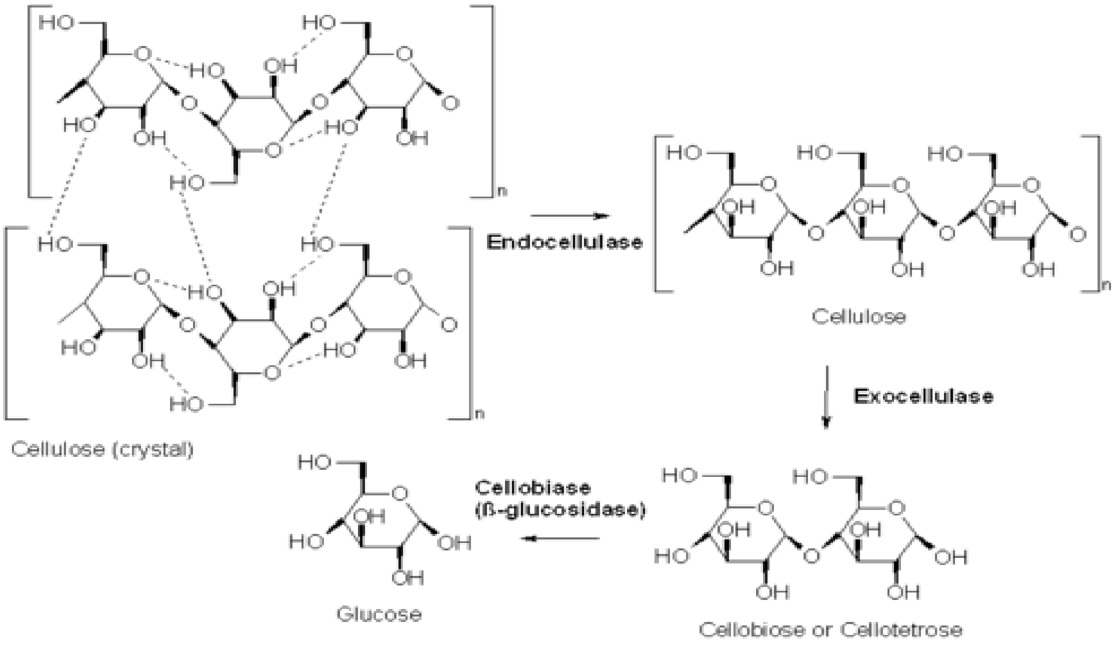
وتوجد مجموعة إنزيمات السليولوز في جسيمات قرب سطح الخلية الميكروبية المحللة للسليولوز تسمى Cellulosome تقوم بربط جزئ السليولوز بسطح الخلية ثم إفراز الإنزيمات المحللة للسيليولوز. أما إنزيم β-1,4 glucosidase فهو إنزيم داخلي.

خطوات تحلل السليولوز

Cellulose $\xrightarrow{C1}$ **Chains of cello-oligo-saccharides**

Cello-oligo-saccharides $\xrightarrow{Cx}$ **Oligo-saccharides + cellobiose**

Cellobiose $\xrightarrow{Cellobiase}$ **glucose**



وتقسم الكائنات الحية الدقيقة المحللة للسليولوز إلى:

- ميكروبات هوائية: من أنشطها ميكروب .*Cytophaga* sp وهى تحلل السليولوز إلى جلوكوز ثم إلى $H_2O + CO_2$.
- ميكروبات لاهوائية: وهى إما محبة لدرجة الحرارة المتوسطة مثل *Cl. dissolvens* وإما محبة لدرجة الحرارة العالية مثل *Cl. thermocellum* وتحلل السليولوز إلى أحماض عضوية، CO_2 ، H_2 , CH_4.

أولا: تحليل السليولوز هوائياً Aerobic cellulose decomposition

الأدوات والمواد اللازمة

- عينة تربة معاملة بالمواد العضوية.
- بيئة ديبوس Dubo's medium المعقمة فى أنابيب وهى تتكون من:

Components	g/L
$NaNO_3$	0.5
K_2HPO_4	1.0
$MgSO_4.7H_2O$	0.5
KCl	0.5
$FeCl_3$	Traces
Distilled water	1000 ml
pH	7.5

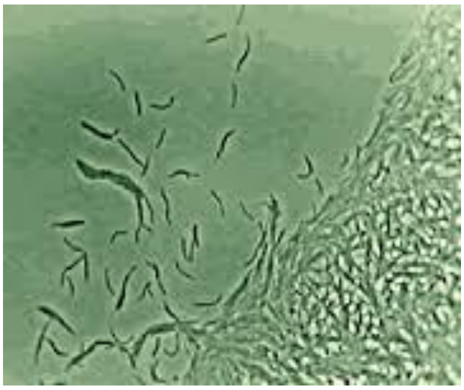
ويوضع بها شرائط من ورق الترشيح كمصدر للكربون.

خطوات العمل

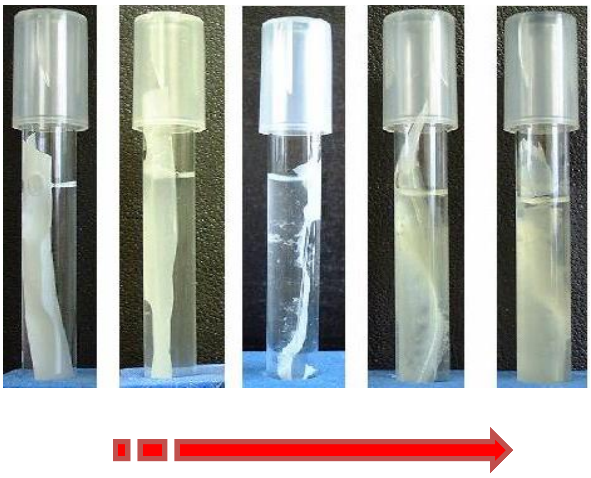
- يأخذ ½ جرام من عينة التربة ثم يوضع فى كل أنبوبة بها بيئة ديبوس (٤ أنابيب).
- تترك أنبوبتين بدون تلقيح كمقارنة.
- تحضن أنبوبتين على درجة حرارة ٣٠°م وأنبوبتين على حرارة ٥٠°م.
- تفحص الأنابيب أسبوعياً لمدة شهر.

الملاحظة

لاحظ التآكل أو ظهور بقع صفراء ويدل ذلك على نشاط الميكروبات فى تحليل السليولوز



Cytophaga sp.



لاحظ مراحل التحلل مع إتجاه السهم

ثانيا: تحليل السليولوز لاهوائياً Anaerobic cellulose decomposition

الأدوات والمواد اللازمة

- عينة من سماد الإسطبل.
- بيئه أوملیانسكى Omeliansky's medium وهى تتكون من:

Components	g/L
$(NH_4)_2SO_4$	1.0
$MgSO_4.7H_2O$	0.50
$CaSO_4$	2.0
K_2HPO_4	1.0
NaCl	Traces
Distilled water	1000 ml
pH	7.0

ويوضع بها شرائط من ورق الترشيح كمصدر للكربون.

- فاسبار معقم.

خطوات العمل

- تلقح أنابيب بيئه أوملیانسكى بعينة من سماد الإسطبل (½ جرام/ أنبوبة) (٤ أنابيب).
- ضع ٢ ملليلتر من الفاسبار المعقم السايح على سطح البيئة تحت شروط التعقيم لجعل الظروف لاهوائية.
- تترك أنبوبتين بدون تلقيح كمقارنة.
- تحضن أنبوبتين على درجة حرارة ٣٠°م وأنبوبتين على حرارة ٥٠°م.
- تفحص الأنابيب أسبوعياً لمدة شهر.

الملاحظة

لاحظ التآكل أو ظهور بقع صفراء ويدل ذلك على نشاط الميكروبات فى تحليل السليولوز لاهوائيا.

Clostridium sp.

لاحظ مراحل التحلل مع إتجاه السهم

تقدير إنزيم الجيلاتينيز Gelatinase

لبعض الكائنات الحية الدقيقة القدرة على إفراز إنزيم الجيلاتينيز Gelatinase وهو إنزيم خارجي يحلل الجيلاتين ويفقده خاصية التصلب ويحوله إلى الحالة السائلة Liquefaction، والجيلاتين عبارة عن مادة بروتينية تحضر من الكولاجين Colagen وتجدر الإشارة إلى أن الجيلاتين له خاصية التصلب على درجة حرارة أقل من ٢٥°م أما على درجات حرارة أعلى من ذلك فإن الجيلاتين يتحول إلى الحالة السائلة وعادة تؤخذ قدرة الميكروبات على إسالة الجيلاتين كدليل على قدرته على تحليل البروتين.

الأدوات والمواد اللازمة

- مزارع حديثة العمر من الميكروبات الآتية: *B. subtilis. Pr. vulgaris and E. coli*
- أنابيب بيئة الجيلاتين المغذى العميق Nutrient gelatin وتتكون من:

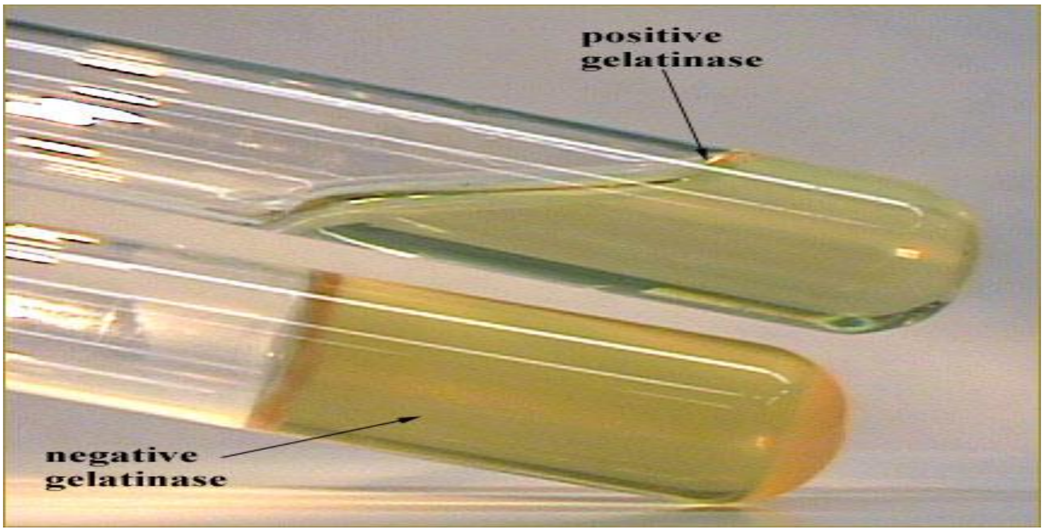
Components	g/L
Beef extract	5.0
Gelatin	150
Distilled water	1000 ml
pH	7.0

خطوات العمل

- يلقح ٢ أنبوبة من بيئة الجيلاتين المغذى العميق بكل من أنواع المزارع السابقة بطريقة الوخز مع ترك أنبوبة بيئة بدون تلقيح كمقارنة.
- تحضن الأنابيب على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة.
- بعد فترة التحضين تنقل الأنابيب إلى ثلاجة أو كأس به ماء مثلج لمدة نصف ساعة.

الملاحظة

إذا تجمد الجيلاتين دل ذلك على عدم قدرة الميكروب على تحليل الجيلاتبن أما إذا ظل الجيلاتين سائل دل ذلك على تحلله.



تقدير إنزيم الليبيز Lipases

تستطيع بعض الميكروبات تحليل الدهون وينتج عن تحليل الجليسريدات ذات الوزن الجزيئى المنخفض جليسرين وأحماض دهنية طياره أما الجليسريدات ذات الوزن الجزيئى العالى فتتحلل إلى جليسرين وأحماض دهنيه ثابتة.

الأدوات والمواد اللازمة

- مزارع الميكروبات *Ps. fluorescence, E. coli, B. subtilis*

أنابيب بيئة أجار مغذى تتركب من المواد التاية بمعدل (g/L):

Components	g/L
Peptone	10
calcium chloride	0.1
sodium chloride	5
Agar	15
Sterile Tween 20	10 mL
Distilled water	1000 ml
pH	7

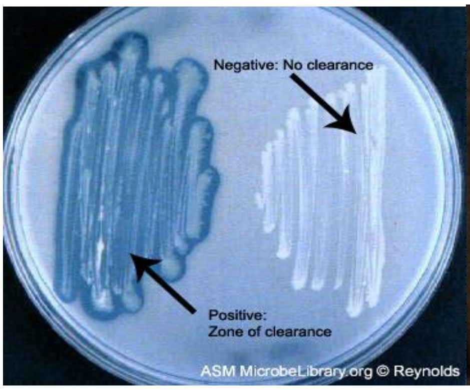
- أطباق بترى معقمة.
- محلول كبريتات النحاس مركز (٢٠%).
- زيت بذرة القطن المعقم أو Tween 20 معقم.

خطوات العمل

- تسيح أنابيب الأجار المغذى - وتبرد إلى ٤٥°م.
- يصب الأجار فى طبق بترى معقم ويترك حتى يتصلب.
- يلقح كل طبق بأحد الميكروبات ثم التحضين على درجة ٣٧°م لمدة ٣-٤ أيام.
- بعد فترة التحضين تغمر الأطباق بمحلول كبريتات النحاس المركز.

الملاحظة

يلاحظ تكون لون أخضر مزرق حول الميكروبات المحللة للدهون نتيجة لإتحاد الأحماض الدهنية الناتجة من تحلل الزيت مع كبريتات النحاس.



تقدير إنزيمات البكتينيز Pectinases

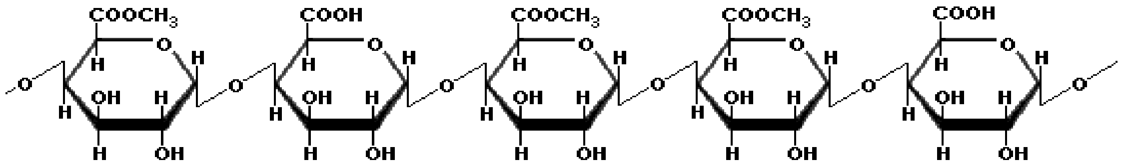
توجد المواد البكتينية بوفرة في الصفائح الوسطي فهي المركبات التي توجد بين الخلايا في الأنسجة النباتية، ووجود البكتين بين خلايا النسيج يعمل علي ربطها مع بعضها. وتحتوي الجدر الأولية والثانوية للخلية علي سكريات عديدة من هذا النوع أيضاً.

والمواد الكربوهيدراتية البكتينية عبارة عن سكريات عديدة معقدة التركيب تتكون من وحدات من حامض الجلاكتويورونيك ترتبط مع بعضها البعض لتكون سلسلة طويلة. وتوجد ثلاث أنواع من المواد البكتينية هى:

(أ) البروتوبكتين وهو أحد مكونات جدار الخلية وهو ذائب في الماء مكون من وحدات من حامض الجلاكتويورونيك ويحتوي علي كثير من روابط استرات الميثايل.

(ب) البكتين وهو بوليمر ذائب في الماء يشبه السابق في تركيبه ونسبة مجاميع الأستر به حوالي ٨%.

(ج) حامض البكتيك وهي بوليمر من حامض الجلاكتويورونيك وهو ذائب في الماء ولا يوجد به روابط استرات الميثايل.



وحدات من سلسلة حمض الجلاكتورنيك حيث يحتوي بعضها علي روابط ميثيل استر

ومجموعة الإنزيمات المحللة للبكتين تتكون من مجموعة من الإنزيمات أهمها:

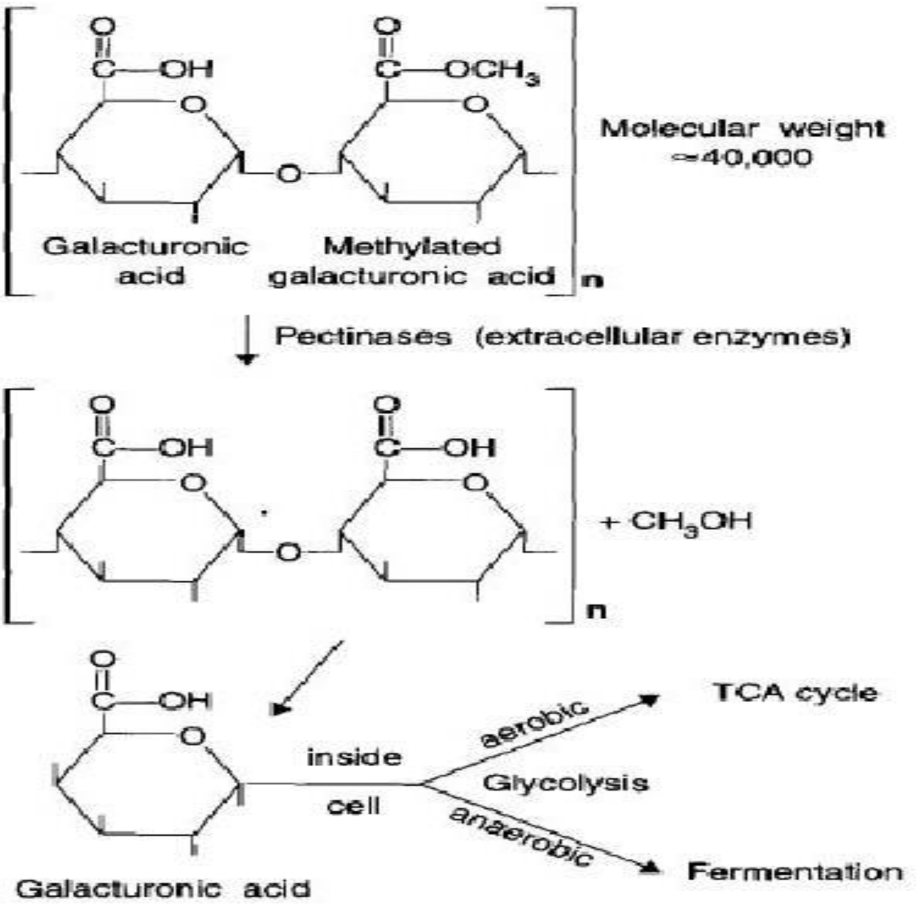
١) Pectolyase (Pectin lyase): ينتج بواسطة الكائنات الحية الدقيقة وينتج على نطاق تجارى لإستخدامه فى تصنيع العصائر.

٢) Polygalacturonase (Pectinase): ينتج داخل النبات ويساعد فى عملية إنضاج الثمار.

لكل من البكتريا والفطريات والأكتينوميسيتات القدرة علي تحليل المواد البكتينية تحليلا مائيا حيث تستخدم هذه السكريات العديدة كمصادر للطاقة اللازمة للنمو. ويكثر وجود هذه الكائنات الحية الدقيقة في التربة فحسب وخاصة في منطقة الجذور حيث وجد أن أعدادها تتجاوز $١٠^{٧}$ في الجرام من التربة الملاصقة مباشرة لجذور النباتات.

ومن أهم الأجناس البكتيرية النشطة في تحليل البكتين:

Arthrobacter, *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Erwinia* and *Peusdomonas*



يعتبر ميكروب *Erwinia caratovora* هو المسبب الأساسي لمرض العفن الطري حيث يؤدى نمو هذا الميكروب داخل الأنسجة النباتية إلى تفكك الخلايا بسبب قدرة هذا الميكروب على إفراز الإنزيمات المحللة للمواد البكتينية. أيضا وجد أن قدرة الفطريات المسببة للذبول Wilting يرجع إلى إفراز مثل هذه الفطريات على إفراز الإنزيمات المحللة للمواد البكتينية.

الأدوات والمواد اللازمة

- مزارع الميكروبات *Ps. fluorescence, Erwinia caratovora, E. coli, B. subtilis*
- بيئة أجار مغذى يكون بها مصدر الكربون الوحيد بها هو البكتين وهى تتركب من:

Components	g/L
Pectine	5.0
$KHPO_4$	4.0
Na_2HPO_4	6.0
yeast extract	1.0
Agar	20
Distilled water	1000 ml
pH	7.0

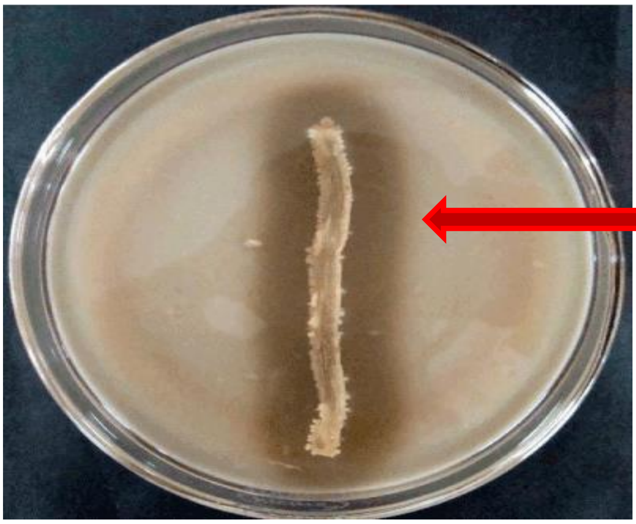
- أطباق بترى معقمة.

خطوات العمل

- تسيح أنابيب الأجار المغذى - وتبرد إلى ٤٥°م وتصب فى أطباق بترى معقمة وتترك حتى تتصلب.
- يلقح كل طبق بأحد الميكروبات ثم التحضين على درجة ٣٧°م لمدة ٣-٤ أيام.

الملاحظة

يلاحظ نمو الميكروبات على البيئة الغذائية ومجرد النمو وتكوين هالة شفافة حول النمو على بيئة مصدر الكربون الوحيد فيها هو البكتين فيدل ذلك على قدرة الميكروب على إنتاج إنزيم البكتينيز.



لاحظ نمو البكتريا والهالة حول النمو

تقدير إنزيم الأوكسيديز Oxidase

الأوكسيديز هو إنزيم مؤكسد ضمن سلسلة الإنزيمات التنفسية المسؤلة عن تفاعلات الفسفرة التأكسدية فنجد أن البكتيريا التابعة لعائلة Enterobacteriaceae (سالبة) ومعظم الأنواع التابعة لجنس *Pseudomonas* (موجبة) مثل بكتريا *Pseudomonas aeroginosa*.

الأدوات والمواد المطلوبة

- بيئة أجار الجلوكوز Glucose agar وتتكون من:

Components	g/L
Beef extract	3
Peptone	5
Glucose	10
Agar	20
Distilled water	1000 ml
pH	7

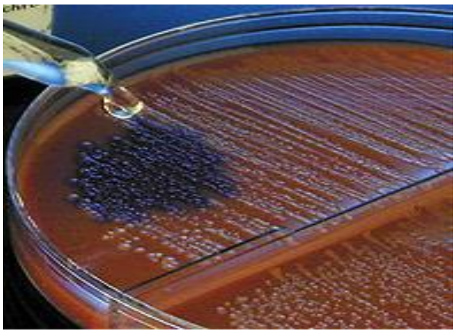
- البكتريا المراد إختبار قدرتها على إنتاج الإنزيم.
- أطباق بترى معقمة.
- محلول الأكسيديز (١% داي ميثيل فينيل داي أمين هيدروكلورايد (Dimethyl phenylenediamine hydrochloride.

طريقة العمل

- تصب البيئة فى أطباق بترى المعقمة وتترك حتى تتصلب.
- تلقح الأطباق بالبكتريا المراد إختبارها ويترك طبق آخر بدون تلقيح كمقارنة.
- تحضن الأطباق على ٣٠-٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة.
- يغمر سطح المزرعة بقليل من المحلول.

الملاحظة

تظهر المستعمرات الموجبة لإنتاج الإنزيم وردية اللون ثم تتدرج لتصبح بنية ثم حمراء داكنة ثم سوداء



تقدير إنزيمات البروتيز Protease

العديد من الكائنات الحية الدقيقة (خاصة البكتريا) لها القدرة على لإفراز إنزيمات لها القدرة على تحليل البروتين وهى إنزيمات البروتيز Protease (Protinase or Peptidase) وهى مجموعة من الإنزيمات البروتينية والتي تعمل على التحلل البروتيني، حيث يبدأ بهدم البروتينات بواسطة التحليل المائي للببتيد في الروابط التي تربط الأحماض الأمينية معا في سلسلة ببتيد تشكيل البروتين. وهذا الإنزيم أحد الإنزيمات التي تساعد على الهضم، والذي يقوم بتفكيك البروتينات في المعدة والأمعاء إلى مركباتها الأساسية (أحماض أمينية).

الأدوات والمواد اللازمة

- مزارع الميكروبات *E. coli, B. licheniformis*
- بيئة Skim mild agar (SMA) وهى تتركب من:

Components	g/L
Skim milk	15.0
yeast extract	5.0
Agar	20
Distilled water	1000 ml
pH	7.0

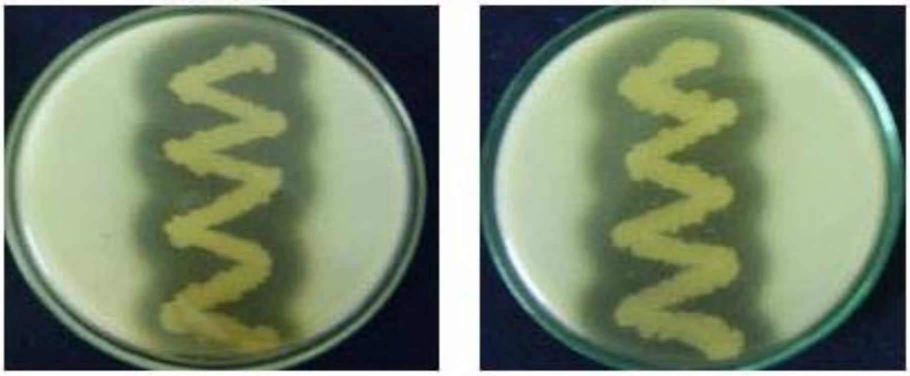
- أطباق بترى معقمة.

خطوات العمل

- تسيح بيئة SMA - وتبرد إلى ٤٥°م وتصب فى أطباق بترى معقمة وتترك حتى تتصلب.
- يلقح كل طبق بأحد الميكروبات ثم التحضين على درجة ٢٧°م لمدة ٤٨ ساعة.

الملاحظة

يلاحظ نمو الميكروبات على البيئة الغذائية ومجرد النمو وتكوين هالة شفافة حول النمو فيدل ذلك على قدرة الميكروب على إنتاج إنزيم البروتييز.



The zones of clearance on skim mild agar plates produced by parent strain *B. licheniformis* N-2 and its various mutants after incubation at 37°C for 24 h

تقدير إنزيم اليوريز Urease

تقوم كثير من ميكروبات التربة الزراعية بتحليل اليوريا الى أمونيا والبكتريا النتخصصة والتى تعتمد على هذا التفاعل تسمى Urea bacteria ومنها *Bacillus pasteurii* وكذلك بكتريا *Sarcina urea* وتقوم هذه البكتريا بعملية التحلل عن طريق إفراز إنزيم اليوريز Urease .

الأدوات والمواد اللازمة

- عينة تربة.
- دليل أحمر الفينول Phenol red.
- حامض HCl مخفف.
- بيئة آجار اليوريا Urea agar وتتكون من:

Components	g/L
Peptone	**1**
Glucose	**1**
NaCl	**5**
KH_2PO_4	**2**
Phenol red	**0.012**
Agar	**20**
Distilled water	**1000 ml**
pH	**6.9**

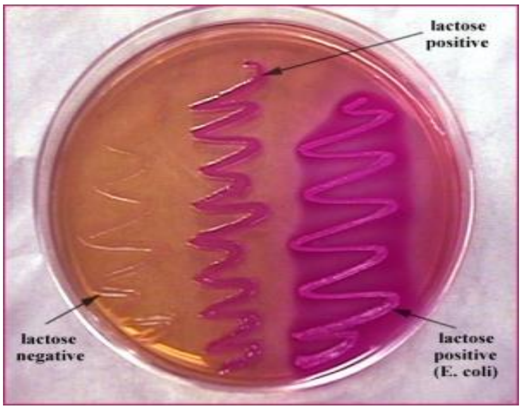
- تعقم البيئة فى الأوتوكلاف.
- يوريا (تحضر محلول اليوريا ٢٩ % ويعقم بالترشيح ويضاف منه ١٠ مل/١٠٠ مل من البيئة الأساسية المذابة والمبردة لدرجة ٥٠ْم لعدم تكسر اليوريا بالحرارة العالية ثم توزع بيئة اليوريا في أنابيب بمقدار ٣ مل لكل أنبوب وتبرد بشكل مائل حتى تتصلب.

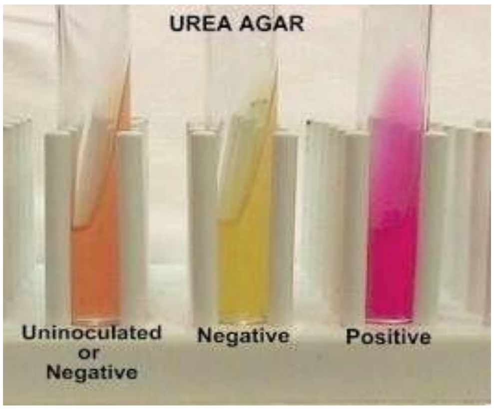
طريقة العمل

- تلقح الأنابيب بالميكروبات السابقة مع ترك انبوبة بدون تلقيح للمقارنة.
- ضع الأنابيب فى المحضن لمدة ٢-٣ أيام على درجة ٣٠ °م.

الملاحظة

لاحظ تغير لون الدليل من اللون الأصفر أو البصلى الفاتح الى اللون البنفسجى او الأحمر فى حالة الميكروبات المحللة لليوريا والمنتجة لإنزيم اليوريز.





تقدير إنزيم الكازينيز Caseinase

الكازين هو البروتين السائد في اللبن (يعطي اللون الأبيض) وهناك الكثير من البكتيريا تفرز الانزيم الخارجي Caseinase الذي يحلل الكازين الى مواد ذائبة شفافة مثل بكتريا *Bacillus subtilis*.

الأدوات والمواد المطلوبة

- بيئة أجار اللبن Milk agar وتتكون من:

Components	g/L
Skim milk powder	28
Casein enzymic hydrolysate	5
Yeast extract	2.5
Dextrose	1
Agar	20
Distilled water	1000 ml
pH	7

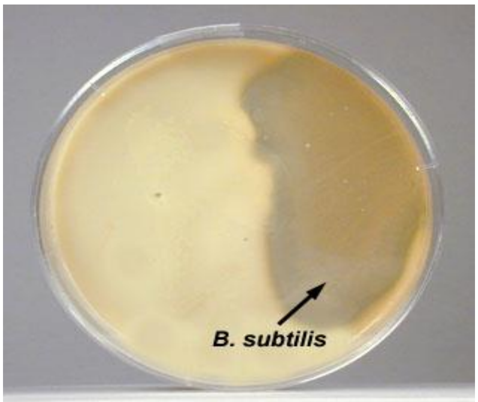
- الأنواع البكتيرية المراد إختبار قدرتها على إفراز إنزيم الكازينيز.

طريقة العمل

- تصب البيئة فى أطباق بترى وتترك حتى تتصلب.
- تلقح الأطباق ببكتيريا حديثة النمو بإبرة التلقيح ويترك طبق بدون تلقيح كمقارنة.
- تحضن الأطباق مقلوبة على درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤- ٤٨ساعة.
- تسجل النتيجة بعد التحضين مباشرة.

الملاحظة

إذا لاحظت وجود هالة شفافة حول النمو البكتيري يدل ذلك على أن البكتيريا حللت الكازين بإفراز إنزيم الكازينيز، وإذا لم يوجد منطقة رائقة حول النمو دليل على عدم قدرة البكتيريا على تحلل الكازين.



تقدير إنزيم Cysteine desulforase

الأحماض الأمينية هي ناتج تحلل البروتينات ويمكن لبعض الأجناس البكتيرية أن تحلل بعض هذه الأحماض الأمينية محولة إياها الى مواد أبسط تركيبا. فنجد أن بعض الأنواع البكتيرية تنتج غاز كبريتوز الهيدروجين H_2S عند تحللها للحمض الأمينيCysteine (حمض اميني يحتوي على الكبريت) بواسطة إفرازها لإنزيم Cysteine desulforase.

الأدوات والمواد المطلوبة

- بيئة Kligler agar media فى أنابيب وتتكون من:

Components	g/L
Beef extract	3
Yeast extract	3
Peptone	15
Protease peptone	5
lactose	10
Glucose	1
$FeSO_4$	0.2
NaCl	5
$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$	0.3
Phenol red	0.024
Agar	20
Distilled water	1000 ml
pH	7

طريقة العمل

- تلقح الأنابيب بطريقة الوخز بمزرعة بكتيرية حديثة من بكتريا *Proteus vulgaris* وتترك أنبوبة بدون تلقيح كمقارنة.
- تحضن الأنابيب عند ٣٠-٣٧°م لمدة من ٢-٧ أيام.

الملاحظة

تسجل النتيجة الموجبة على أساس وجود راسب إسود على طول خط الوخز في حالة تكون غازH_2S، كما يلاحظ تغير لون البيئة الأحمر الى الأصفر نتيجة إنخفاض قيمة pH بسبب تكون الأحماض.

لاحظ تكون لون إسود على طول خط الوخز نظرا لتكون H_2S الذى يتحد مع كبريتات الحديدوز وتكون كبريتيد الحديدوز (لون إسود).

تقدير إنزيم التربتوفاناز Tryptophanase

بعض البكتيريا مثل *E. coli* تحلل جزيء التربتوفان (حمض أمينى حلقى) إلى جزئ الإندول وحمض البيروفيك بواسطة إنزيم Tryptophanase.

الأدوات والمواد المطلوبة

- بيئة مرق التربتون Trypton broth وتتكون من:

Components	g/L
Trptone	10
Yeast extract	5
kH_2PO_4	5
Glucose	1
Distilled water	1000 ml
pH	7

OR

Components	g/L
Beef extract	3
Trptone	10
Distilled water	1000 ml
pH	7

- البكتريا المراد إختبارقدرتها على تحليل التربتوفان.
- دليل كوفاك Kovack's reagent الذى يتم تحضيره كالتالى:

يذاب ١٠جم من مركب p-dimethyl aminobenzaldehyde فى ١٥٠مل من isoamyl alcohol وبعد ذلك يضاف ٥٠ مل من حامض HCl المركز على جدار الوعاء.

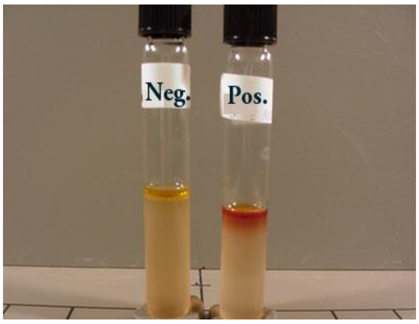
طريقة العمل

- تلقح أنابيب بيئة مرق التربتون الغنية بالحمض الأميني التربتوفان ببكتيريا حديثة العمر وتترك أانبوبة أخرى للمقارنة.
- تحضن الأنابيب عند ٣٠°م لمدة ٤٨ساعة.
- يكشف عن قدرة البكتيريا على إنتاج الإندول بإضافة ٠,٣- ٠,٥ مل من دليل كوفاك لكل أنبوبة ثم تخلط جيدا.

الملاحظة

فنلاحظ بعد الرج مباشرة إنفصال طبقة كحولية فوق المخلوط ويتحول لون هذه الطبقة إلى اللون الأحمر بعد عدة دقائق في حال وجود الإندول ويكون ذلك دليل على قدرة البكتريا على إفراز الإنزيم المحلل للتربتوفان والمنتج للإندول الذى يتحد مع الدليل ويعطى اللون الوردى (نتيجة موجبة).

(+) Indole test on left — (-) Indole test on right



تقدير إنزيم تحلل الحمض النووي Deoxyribonuclease (DNase)

يعمل إنزيم DNase على تكسير رابطة الفوسفوداى إستر فى جزئ الـ DNA وخاصة النهايات الطرفية للجزى.

الأدوات والمواد المطلوبة

- بيئة أجار مغذي مضاف إليها الحمض النووى DNA .
- أطباق بتري معقمة.
- المزارع البكتيرية المراد إختبار قدرتها على إنتاج الإنزيم.
- محلول 1N HCl

طريقة العمل

- تصب البيئة فى أطباق بترى وتترك حتى تتصلب.
- تلقح الأطباق بالمزارع البكتيرية حديثة العمر ويترك طبق بدون تلقيح كمقارنة.
- تحضن الأطباق على ٣٧°م لمدة ٢٤ساعة.
- يكشف عن تحلل الـ DNA بإضافة (1N HCL) على سطح الطبق.

الملاحظة

تكون مناطق شفافة حول النمو البكتيري دليل على أن البكتيريا أنتجت إنزيم DNase فى الوسط الخارجي وحللت مادة DNA في البيئة.